

Hermostopienan kehitys

Jens Laine

LuK-tutkielma

Biologian tutkinto-ohjelma

Oulun yliopisto

Elokuu 2020

Sisällys

| | |
|--|----|
| 1. Johdanto..... | 3 |
| 2. Hermostopienan induktio..... | 4 |
| 3. Hermostopienan irtoaminen neuroepiteelistä..... | 5 |
| 3.1. Delaminaatio..... | 5 |
| 3.2. Epiteeli-mesenkyymi-transitio..... | 6 |
| 4. Hermostopienan johdannaiset..... | 7 |
| 4.1. Alapopulaatiot..... | 7 |
| 4.2. Kraniaalinen hermostopiena..... | 8 |
| 4.3. Vagaalinen hermostopiena..... | 9 |
| 4.4. Vartalon hermostopiena..... | 9 |
| 4.5. Sakraalinen hermostopiena..... | 10 |
| 5. Hermostopienan vuorovaikutukset ympäröivän kudoksen kanssa..... | 10 |
| 5.1 Inhibiittorimolekyylit..... | 10 |
| 5.2 Tilan rajaaminen..... | 12 |
| 6. Solujenväliset vuorovaikutukset..... | 13 |
| 6.1 Kontaktivälitteinen inhibitio..... | 13 |
| 6.2 Kemotaksia..... | 16 |
| 7. Hermostopienan tutkimuksen tulevaisuus..... | 18 |
| 8. Viiteluottelo..... | 20 |

1. Johdanto

Hermostopiena on selkärankaisten alkionkehityksen aikana esiintyvä väliaikainen rakenne, joka koostuu erittäin monikykyisistä soluista, jotka lopulta erilaistuvat moniksi eri solutyypeiksi, kuten luiksi lihaksiksi ja hermosoluiksi. Hermostopienan muodostuminen on selkärankaisten erityispiirre ja sillä on ollut merkittävä rooli niiden evoluutiossa. Hermostopienasta muodostuvat leuat mahdollistivat pedon elämäntapoihin siirtymisen. Selkärankaisten pään alueen aistinelinten uudelleenjärjestäytyminen oli myös seuraus hermostopienan kehittymisestä.

Hermostopiena saa alkunsa alkionkehityksen neurulaatiovaiheen aikana, kun se indusoituu hermostolevyn sivureunoille. Neurulaation jälkeen hermostopienan solut irtaantuvat neuroepiteelistä hermostoputken ja epidermin väliseen tilaan, käyden samalla läpi epiteeli-mesenkyymi-transition. Irronneet solut lähtevät vaeltamaan ympäri alkioita tarkasti säädeltyinä virtoina. Näitä virtoja säätelevät muun muassa sellaiset tekijät ja prosessit, kuin inhibiittorimolekyylit, migraatiotilan rajaaminen (engl. confinement), Kontaktivälitteinen inhibitio (engl. contact inhibition of locomotion, CIL) ja kemotaksia. Kohdealueilleen päästyään hermostopienan solut erikoistuvat häkellyttäväksi määräksi erilaisia rakenteita, kuten pään alueen luiksi ja aistinelimiksi, sydämen lihaksiksi, sekä ruoansulatusjärjestelmän hermostoksi.

Hermostopienan kehityksessä esiintyvät ongelmat ovat taustalla useiden ihmisissä esiintyvien syndroomien synnyssä ja lisäksi hermostopienan solut käyttävät migraationsa aikana strategioita, jotka muistuttavat syövän metastaasin mekanismeja. Hermostopiena on siis hyvä kohde solujen erilaistumisen, kantasolujen ominaisuuksien, sekä epiteeli-mesenkyymi-transition ja solujen ohjautumisen tutkimiseen. Tästä johtuen hermostopienan soluista on tullut houkutteleva kohde kehitys- ja evoluutiobiologeille, sekä syöpäbiologeille ja patologeille.

Tämän tutkielman tarkoituksena on selvittää hermostopienan muodostumista, kehitystä, migraatiota ja erilaistumista erinäisiksi johdannaisiksi, sekä kuvata näitä prosesseja ohjaavien geneettisten ja molekulaaristen verkostojen pääpiirteet. Tutkielmassa keskitytään tarkastelemaan erityisesti solujen liikkumista ja sitä sääteleviä mekanismeja.

2. Hermostopienan induktio

Neurulaatio on yksi monista tärkeistä tapahtumista selkärankaisten alkionkehityksen aikana. Se on organogeneesin vaihe, jonka aikana muodostuu hermostoputki, alkion keskushermoston esiaste, joka myöhemmin muuntuu niiksi primitiivisiksi rakenteiksi, joista keskushermosto lopulta muodostuu (Sariola ym., 2015).

Neurulaatiota edeltävässä gastrulaatiossa alkio on muuntunut yhden solukerroksen paksuisesta blastulasta monikerroksiseksi gastrulaksi (Solnica-Krezel & Sepich, 2012). Gastrulavaiheen alkio on jakautunut kolmeksi alkiokerrokseksi: ulkopintaa peittäväksi ektodermiksi, sisäiseksi putkimaiseksi endodermiksi ja näiden kahden välissä sijaitsevaksi mesodermiksi (Mcclay, 1991). Endodermin soluista muodostuu ruoansulatuskanavan sisäpinta: nielu, ruokatorvi, mahalaukku sekä ohut-, paksu- ja peräsuoli. Mesodermistä muodostuu muun muassa selkäranka, selkäjänne, sydän, verisuonet, verisolut, munuaiset, lihakset ja luita. Ektodermistä erilaistuu hermostolevy, pintaektodermi, pään ja nielun alueen ns. plakodit ja hermostopiena (Sariola ym., 2015). Neurulaatio alkaa välittömästi gastrulaation jälkeen (Mayanil 2013).

Selkäjänne on keskeisessä roolissa neurulaation alkamisessa, sillä se indusoi yläpuolellaan olevaan ektodermiin hermostolevyn eli neuraalisen ektodermin muodostumisen (Sariola ym., 2015). Hermostolevyn reunat alkavat paksuuntua ja taipua ylöspäin, muodostaen hermostolaskokset (engl. neural folds), mutta sen keskiosa pysyy aloillaan. Tämän seurauksena syntyy U:n muotoinen uurre, hermostokouru, joka muodostaa alkion keskilinjan, jakaen sen oikeaan ja vasempaan puoliskoon (Mayanil, 2013). Hermostolaskokset alkavat kääntyvä kohti alkion sisäosia ja liittyvät lopulta yhteen, minkä seurauksena uurre sulkeutuu muodostaen hermostoputken. Hermostoputken yläpuolelle muodostuu epidermi, kun hermostolevyn ulkosivuille jäänyt ei-neuraalisen ektodermin alueet liittyvät yhteen. Hermostoputken ja epidermin väliseen tilaan muodostuu hermostopiena.

Hermostopienan induktio on kuitenkin alkanut jo aiemmin. Induktio alkaa primäärisen neurulaation alkuvaiheessa, hermostolevyn muodostuessa ektodermiin. Hermostopiena indusoituu hermostolevyn eli neuraalisen ektodermin, sekä sen sivuille jäävän ei-neuraalisen ektodermin rajapintaan. Hermostopienan induktion laittaa alulle näiden kahden kudoksen, sekä mesodermin välinen viestintä ja sitä näyttäisi ohjaavan Wnt ja BMP (bone morphogenic

proteins) signalointireitit (Mayanil, 2013). Hermostolevyn rajalla induktiota säätelevät mesodermin lähettämät signaalit, jotka sisältävät esimerkiksi fibroblastikasvutekijöitä (FGF) sekä Wnt-signalointia (Mayanil, 2013). Yksi tai useampi näistä signaaleista indusoi yksittäisten hermostolevyn rajan määrittäjien (engl. neural plate border spesifiers), kuten Pax3 ja Zic1, ekspressiota tavalla, joka on riippuvainen keskiuudesta BMP-tasosta (Mayanil, 2013). Pax3 ja Zic1 myös lisäävät hermostopienan induktiota edistävien tekijöiden ekspressiota hermostolaskoksissa ja dorsaalisessa hermostoputkessa (Mayanil, 2013). Solujen erikoistumisen hermostopienaksi hermostolevyn rajalla ohjaavat geenit, kuten *Zic1*, *Msx1*, *Msx2*, *Dlx3*, *Dlx5*, *Pax3*, *Pax7*, *Snail1* ja *AP-2*, joista *Pax3*:a ja *Zic1*:tä säädellään itsenäisesti, mutta ne toimivat kuitenkin Wnt:stä riippuvalla tavalla synergisesti hermostopienan induktiosta vastaavien geenien, kuten *Snail2* ja *FoxD3* aktivaatiossa (Mayanil, 2013). *Zic1*:tä ja *Pax3*:a täytyy esiintyä oikeassa suhteessa hermostopienan indusoimiseksi (Mayanil, 2013).

Induktion jälkeen hermostopienan solut vaeltavat ympäri alkioita, erikoistuen samalla hakeutuviksi määräksi erilaisia rakenteita. Erikoistumisessa on kolme eri vaihetta: delaminaatio (engl. delamination), epiteeli-mesenkyyymi-transitio (EMT) ja viimeisenä erikoistumisen määräytyminen ja sen toteutus (Mayanil, 2013).

3. Hermostopienan irtaantuminen neuroepiteelistä

3.1. Delaminaatio

Induktion jälkeen hermostopienan solut irtaantuvat ympäröivästä neuroepiteelistä delaminaatioksi kutsutussa tapahtumassa, jossa on osallisena vähintään osittainen EMT (Theveneau, 2012). Delaminaatio on prosessi, jossa solut irtoavat kudoksesta ja jakautuvat eri populaatioiksi. Ennen delaminaation alkua hermostopienan solut pysyvät yhdessä N-kadherinin säätelemän vahvan solujenvälisen kiinnittymisen ansiosta (Mayanil, 2013). Delaminaatiossa hermostopienan solujen ekspressoima kadheriini vaihdetaan N-kadherinista heikompaa kiinnittymistä tuottaviin kadheriineihin: kadheriini-7 ja kadheriini-11 (Mayanil, 2013).

Delaminaation laukaisee BMP/kanoninen Wnt kaskadi, jossa mukana toimivat: BMP4, Wnt1, *Msx1* ja *c-Myb*, mikä promotoi EMT:tä aktivoimalla *Snail2*- ja *Foxd3*-geenejä, sekä SoxE-geeniperheen jäseniä (Mayanil, 2013). *Snail2*, *Foxd3*, *Sox9* ja *Sox10* aktivoivat β -integriinin ja osallistuvat kadheriiniprofilien vaihtamiseen, jossa N-kadheriini vaihdetaan

kadheriini-6B:ksi, joka vaihdetaan edelleen kadheriini-7:ksi ja kadheriini 11:sta (Mayanil, 2013). Tämä muutos heikompaa kiinnittymistä tuottaviin kadheriineihin edistää solujen irtoamista epiteelistä ja on tärkeä askel hermostopienan muodostumisessa (Mayanil, 2013).

BMP4/Wnt1 kaskadi on myös tärkeä hermostopienan edeltäjäsolujen solusyklin G1/S - tarkistuspisteen ylittämässä. Solusyklin jatkuminen antaa niiden säilyttää identiteettinsä hermostopienan soluina (Mayanil, 2013).

BMP4/Wnt1 kaskadin alkamisella on yhteys somiittien, eli alkulihasjaokkeiden maturaation ja noggin-proteiinin inhibition kanssa. Noggin-proteiini estää hermostopienan delaminaatiota, joten sen inhibitio on tärkeä tekijä hermostopienan solujen aikaisen liikkeelle lähdön mahdollistamisessa (Mayanil, 2013). Somiitit näyttäisivät erikoistuessaan vapauttavan toistaiseksi vielä tunnistamatonta viestiatinetta, joka estää noggin-proteiinin ekspression hermostoputken dorsaalipuolella ja laittaa myös alulle BMP/Wnt kaskadin (Mayanil, 2013).

Kun tätä dataa tarkastellaan kokonaisuutena, nähdään, että hermostopienan delaminaatioon tarvitaan monia erilaisia tekijöitä, mukaan lukien ligandeja ja transkriptiofaktoreita. (Mayanil, 2013)

3.2 Epiteeli-mesenkyymi-transitio

EMT on sarja molekyyli-tason tapahtumia, jotka säätelevät solujen fenotyypin muutosta epiteelisestä mesenkyymaaliseen. EMT:n laittaa alulle solun ulkopuolisten signaalien integraatio. Nämä signaalit sisältävät ekstrasellulaarisen matriisin komponentteja, kuten kollageenia tai hyaluronaania, ja solujen erittämiä ligandeja, kuten TGF β - ja FGF-ligandiperheiden jäseniä (Mayanil, 2013). Nämä reseptorien kautta välittyvät signaalitapahtumat vuorostaan lisäävät *Snail1*-, *Snail2*- ja *FoxD3*-geenien ekspressiota. Nämä geenit kontrolloivat suoraan EMT:n aikana tapahtuvia muutoksia solujen välisissä sidoksissa, solujen liikkuvuudessa ja solujen välisessä adheesiossa (Mayanil, 2013). Jotta EMT voisi tapahtua, premigratooristen hermostopienan solujen, jotka sijaitsevat täysin polarisoituneessa epiteelikerroksessa vyöliitosten ja tiivis liitosten yhteen sitomina, on menetettävä apikaali-basaali suuntainen polarisaationsa ja purettava tiivis liitoksensa (Mayanil, 2013). Näiden tapahtumien yhteydessä tapahtuu lisäksi muutoksia solujen tukirangan organisaatiossa ja solujen adheesio-ominaisuuksissa mahdollistaen solujen neuroepiteelistä irtautumisen ja migraation aloittamisen (Mayanil, 2013).

Kadheriineillä on tärkeä rooli myös EMT:ssä. Tyypin I kadheriinit, jotka tuottavat stabiileja soluryhmittymiä, korvataan mesenkymaalisten solujen tyypin II kadheriineillä, joiden adheesio on paljon heikompi, mahdollistaen hermostopienan solujen liikkuvuuden kasvattamisen (Mayanil, 2013). Hermostopienan spesifioijat: *FoxD3* ja *Snail*, vähentävät N-Cad:in ja E-Cad:in ekspressoitumista, ja samalla kasvattavat mesenkymaalisten migraatioproteiinien, kuten Cad7, ekspressoitumista. Vastaavasti, *Snail* vähentää tiivisliitosten, klaudiinien ja okludiinien ekspressiota, samalla kasvattaen aukkoliitosten määrää ja konneksiini-43 α 1:n ekspressiota (Mayanil, 2013). EMT:n loputtua solut ovat täysin irrallaan neuroepiteelistä ja ovat valmiita aloittamaan vaelluksen (Mayanil, 2013).

4. Hermostopienan johdannaiset

4.1 Alapopulaatiot

Delaminaation ja EMT:n jälkeen hermostopienan solut lähtevät migratoimaan ympäri alkiota (Clay, 2011). Migraatio edellyttää, että solut kykenevät liikkumaan ekstrasellulaarisen matriisin läpi. Solut liikkuvat migraation aikana eräänlaisen ryömimisliikkeen avulla (Bershadsky, 2011). Ryömimisessä solu muodostaa liikesuuntaa kohti ulkoneman, johon muodostuu sidospoteiineja, jotka ankkuroivat solua ekstrasellulaariseen matriisiin, kun samanaikaisesti kulkusuunnan vastaiselta puolelta poistetaan sidospoteiineja (Bershadsky, 2011). Näiden toimintojen ja solun kalvojäännitteen seurauksena solut kulkeutuvat ulkonemien muodostumissuuntaa kohti. (Bershadsky, 2011)

Hermostopienan solut kulkevat tällä tavoin tiettyjä tarkasti rajattuja reittejä pitkin selkeinä virtoina. Niiden migraation alkamisen ajankohdan ja migraation kohteen määrää solujen sijainti alkion pää-häntä akselilla (Szabó & Mayor, 2018). Tälle akselille muodostuu hermostopienan soluja lähes koko alkion pituudelta, väliaivojen peräosista lantion alueelle asti (Rothstein, 2018). Hermostopienan solut voidaan jakaa niiden syntyalueen perusteella neljään selkeään alapopulaatioon: kraniaaliseen hermostopienaan, vagaaliseen hermostopienaan, vartalon hermostopienaan ja sakraaliseen hermostopienaan (Rothstein, 2018). Tämä jaottelu ei ole perustu pelkkään anatomiseen sijaintiin, vaan kunkin alueen solut eroavat myös ominaisuuksiltaan. Eroja on esimerkiksi solujen migraatioreiteissä, erilaistumispotentialissa ja geeniekspressioprofiileissa (Rothstein, 2018).

4.2 Kraniaalinen hermostopiena

Ensimmäisenä liikkeelle lähtee kraniaalinen hermostopiena (Szabó & Mayor, 2018), jonka solut muodostuvat pään alueelle etuaivojen ja ruutuaivojen aivojaokkeen 1. kuudennen rombomeerin väliselle alueelle. Rombomeerit ovat ruutuaivojen segmenttejä, joita on yhteensä seitsemän ($r1 - 7$). Kraniaalisen hermostopienan solut migratoivat leveinä virtoina ja niistä muodostuu useita pään alueen rakenteita (Szabó & Mayor, 2018). Ne vaikuttavat esimerkiksi suuresti kasvojen rakenteiden muodostumiseen, tuottamalla luita ja rustoa kasvoihin ja kaulaan, sekä tuottamalla jäniteitä, lihaksia, ja sidekudosta korviin, silmiin, hampaisiin, sekä verisuoniin. Ne myös tuottavat pigmenttisoluja ja suurimman osan pään alueen ääreishermostosta. Lisäksi ne säätelevät aivojen rakenteiden kaavoittumista ja kasvua (Mayor, 2013). Vesikalvollisilla kraniaalisen hermostopienan solut migratoivat dorsolateraalisesti, käyttäen eri reittejä riippuen niiden syntykohdan sijainnista hermostoputken pää-häntä akselilla. Etu- ja keskiaivojen alueilta tulevat solut kulkevat yhtenäisenä mesenkymaalisena levynä, liikkuen anteriorisesti silmän aihen yli, ja muodostavat lopulta kasvojen alueen rakenteet (Rothstein, 2018). Ruutuaivojen alueelta tulevat solut puolestaan kulkevat lateraalisesti ja ventraalisesti segmentoituneina virtoina asettuen kiduskaariin, jotka ovat kaikilla selkärankaisilla esiintyvä rakenne alkionkehityksen aikana. Nämä virrat muodostuvat ruutuaivojen parillisten rombomeerien tuntumaan, saaden aikaan virtojen segmentoituneen rakenteen (Rothstein, 2018). Ensimmäinen virta (engl. trigeminal neural crest) lähtee keskiaivojen, sekä kahden ensimmäisen rombomeerin alueelta. Toinen virta (engl. hyoid crest) lähtee neljännen rhombomeerin tuntumasta. Kolmas virta (engl. post-otic crest) lähtee liikkeelle kuudennen ja seitsemännen rombomeerin väliseltä alueelta (Rothstein, 2018). Nämä virrat täyttävät sekvenssinomaisesti niitä vastaavat kiduskaaret. Ensimmäinen virta täyttää ensimmäisen kiduskaaren, ja muodostaa lopulta leukaluut, sekä sisäkorvan vasara- ja alaisinluut. Toinen virta kohdistuu toiseen kiduskaareen, josta muodostuu kieliluu, sekä sisäkorvan jalustinluu. Kolmas virta migratoi kolmanteen kiduskaareen, joka osallistuu kilpirauhasen ja lisäkilpirauhasen muodostumiseen (Rothstein, 2018). Jokainen näistä virroista tuottaa myös hermosolmuja pään ja leuan alueelle (Rothstein, 2018). Kaloilla ensimmäisestä kiduskaaresta muodostuu leuka, toisesta kiduskaaresta muodostuu leukaa tukevia rakenteita, ja kolmas kiduskaari osallistuu kidusten muodostukseen yhdessä kiduskaarten 4-7 kanssa (Schilling, 1996).

4.3 Vagaalinen hermostopiena

Vagaalinen hermostopiena sijaitsee kraniaalisen ja vartalon hermostopienojen välissä ja sen solut syntyvät somiittien 1-7 välisellä alueella. Somiittien 1-3 välisellä alueella sijaitsee vagaalisen hermostopienan alapopulaatio, josta käytetään nimitystä sydänhermostopiena (Rothstein, 2018). Sydänhermostopienan solut seuraavat stereotyyppistä dorsolateraalista migraatioreittiä, ja asettuvat sydämeen, sydämen verisuoniin ja kiduskaariin 3-6, joissa ne erikoistuvat sileäksi lihaskudokseksi (Rothstein, 2018). Lintujen ja nisäkkäiden sydänhermostopienalla on tärkeä erityistehtävä: sydämen kammioiden väliseinän muodostaminen (Lee, 2011). Mielenkiintoista tässä on se, että sydänhermostopiena on evolutiivisesti paljon vanhempi kuin sydämen väliseinä, ja se löytyy myös seeprakaloilta, joilla väliseinää ei ole ollenkaan, sekä kynsisammakoilta, joilla on vain osittainen väliseinä, joka ei edes muodostu hermostopienan soluista (Lee, 2011). Seeprakaloilla sydenhermostopienan on osoitettu osallistuvan usean sydämen osan muodostumiseen, mukaan lukien ulosvirtauskanavat, eteinen, ja kammio (Lee, 2011). Kynsisammakoilla sydänhermostopiena osallistuu aorttapussin ja aortankaaren valtimoiden muodostukseen (Lee, 2011). Vagaalisen hermostopienan kaksi muuta populaatiota, jotka saavat alkunsa somiittien 1-3 ja 4-6 välisiltä alueilta, kulkevat ventraalisesti, ja muodostavat enteerisen hermoston vatsalaukkuun ja etusuoleen (Rothstein, 2018). Seitsemännen somiitin alueelle muodostuneet solut osallistuvat melanosyyttien ja ääreishermoston spinaaliganglioiden tuottamiseen (Rothstein, 2018).

4.4 Vartalon hermostopiena

Vartalon hermostopienan solut saavat alkunsa alkion peräosista ja erikoistuvat lähinnä ääreishermoston neuroneiksi ja gliasoluiksi, lisämunuaisen soluiksi, endoneuriumin fibroblasteiksi, ja melanosyyteiksi (Rothstein, 2018). Vartalon hermostopienan migraatio alkaa ahtaassa ympäristössä posteriorisen hermostoputken ympärillä, missä solut ovat läheisessä kontaktissa tulevan epidermoksen, ja paraksiaalisen mesodermin kanssa. Tämä rajaa vartalon hermostopienan solujen migraation spesifisille ennalta määrätyille reiteille, mikä tekee niistä erittäin vastaanottavaisia ympäröivän kudoksen lähettämille fyysisille ja molekulaarisille signaaleille (Rothstein, 2018). Erityisesti somiiteilla on tärkeä rooli migraation reitin ja ajankohdan määrittämisessä. Somiitit toimivat migratoivien solujen eri virroille viestimolekyylien lähteenä, fyysisenä esteenä, sekä migraatiosubstraattina (Rothstein, 2018). Vartalon hermostopienan solut voivat kulkea kolmea eri reittiä pitkin. Nisäkkäillä ja linnuilla nämä reitit ovat ventrolateraalinen reitti hermostoputken ja

somiittien välissä, ventromediaalinen reitti hermostoputken ja sklerotomin välissä, ja dorsolateraalinen reitti ektodermin ja anteriorisen sklerotomin välissä (Rothstein, 2018). Aikaisin migratoivat ventraalisia reittejä käyttävät solut osallistuvat ääreishermoston spinaaliganglioiden muodostukseen, kun taas näitä reittejä käyttävät myöhemmin migratoivat solut erikoistuvat ei-neuraalisiksi johdannaisiksi (Rothstein, 2018). Dorsolateraalista reittiä käyttävät ainoastaan melanosyyttilinjan solut (Rothstein, 2018).

4.5 Sakraalinen hermostopiena

Sakraalinen hermostopiena, joka on tunnistettu ainoastaan vesikalvollisilla, sijaitsee alkion peräosassa välittömästi vartalon hermostopienan takana. Sakraalisella hermostopienalla on tärkeä osa enterisen hermoston muodostumisessa: se muodostaa takasuolta hermottavat solut (Rothstein, 2018). Sakraalinen hermostopiena migratoi ventraalisesti ja kolonisoi suoliston vagaalisen hermostopienan jäljessä. Sakraalinen hermostopiena kykenee levittäytymään suolistoon, vaikka vagaalinen hermostopiena puuttuisi, se ei kuitenkaan pysty kompensoimaan vagaalisten johdannaisten puutetta, mikä viittaisi molekulaarisiin eroihin näiden kahden populaation välillä (Rothstein, 2018). Kyky migratoida takasuoleen on sakraalisen hermostopienan erityisominaisuus. Muiden hermostopienan populaatioiden migraatio loppuu ja takasuolen dorsaalipuolelle (Rothstein, 2018). Transplantaatiotutkimuksissa on todettu, että jopa rinnan tasolta otetut hermostopienan solut kykenevät migratoimaan takasuoleen, mikäli ne ensin siirretään sakraaliselle tasolle, kun taas sakraaliset solut puolestaan menettävät kykynsä migratoida takasuoleen, mikäli ne siirretään ensin rinnan tasolle (Rothstein, 2018). Tästä voidaan päätellä, että sakraalisen hermostopienan solujen käyttämä migraatioreitti määrittää niiden lopullisen kohtalon. Suolen dorsaalinen sijainti alkion takaosassa mahdollistaa siis sakraalisen hermostopienan käyttämän poikkeuksellisen suoran reitin alkion takasuoleen, antaen sen asuttaa enterisen mesenkyymien oikeassa kehityksen vaiheessa (Rothstein, 2018).

5. Hermostopienan vuorovaikutukset ympäröivän kudoksen kanssa

5.1 Inhibiittorimolekyylit

Hermostopienaa ympäröivät kudokset ohjaavat sen migraatiovirtojen muodostumista estämällä solujen migraatiota väärille alueille. Eph/efriini signaali estää soluja kulkemasta tietyille alueille indusoimalla niiden liikkumiseen vaadittavien ulkonemien romahduttamista (Szabó & Mayor, 2018). Tämä signaali on siis yhteydessä migratoivien

hermostopienan solujen populaatioiden rajaamisessa selkeiksi virroiksi. Eph/efriini-tyyppien ekspressiokuviot hermostopienan soluissa korreloivat ympäröivien kudosten vastaavien kuvioden kanssa hiirillä, rotilla, kananpojilla, sammakoilla (Szabó & Mayor, 2018). Kananpojilla esimerkiksi efriiniB1 ekspressoituu pitkin dorsolateraalista reittiä, mikä mahdollistaa EphB2:ta ekspressoivien hermostopienan solujen migraation, mutta hylkii EphB3:a ekspressoivia soluja, jotka tämän seurauksena ohjautuvatkin ventromediaaliselle reitille (Szabó & Mayor, 2018). Samankaltaisesti, dorsolateraalilla reitillä ekspressoidut endoteliinit vetävät puoleensa endoteliinireseptori B2:a (EDNRB2) ekspressoivia soluja, kun taas EDNRB:tä ekspressoivat solut hyljitään pois dorsolateraaliselta reitiltä ja ohjataan ventromediaalista reittiä kohti (Szabó & Mayor, 2018). Eph/efriini signaalin blokkaminen johtaa ektooppiseen, eli virhesijaintiseen, hermostopienan solujen migraatioon ja soluvirtojen sekoittumiseen sekä kraniaalisessa, että vartalon hermostopienassa (Szabó & Mayor, 2018).

Myös luokan 3 semaforiinin (Sema3) blokkaminen aiheuttaa migraatiota virheellisille alueille. Eri semaforiinien vaikutukset todennäköisesti summautuvat keskenään, sillä yhden semaforiinin blokkaminen aiheuttaa verrattain vähän ektooppista migraatiota, kun taas Sema3A:n ja Sema3F:n samanaikainen blokkaminen johtaa hermostopienan jaokkeisen kaavoittumisen menettämiseen ja hermosolmujen yhteen sulautumiseen (Szabó & Mayor, 2018). Semaforiini signalointia avustavat hermostopienan solujen ekspressoimat neuropilinit 1 ja 2 (Nrp1/2), sitoutumalla PlexinA-reseptoriperheen jäseniin. Sema3F:n ja Nrp2:n samanaikainen blokkaminen johtaa segregoitumattomaan migraatioon, jossa solut kulkevat vartalon alueen halki yhtenäisenä levynä, mutta näissä tapauksissa hermosolmujen lopullinen järjestäytyminen säilyy kuitenkin muuttumattomana (Szabó & Mayor, 2018). Sema3F:n ja Nrp1:n blokkaminen saa aikaan hermostopienan solujen ektooppista migraatiota ja häiritsee hermosolmujen järjestäytymistä (Szabó & Mayor, 2018). Semaforiinien eksklusiovaikutus on myös temporaalista, sillä myöhemmissä kehitysvaiheessa kraniaalisen hermostopienan soluja tunkeutuu semaforiinia ekspressoiviin kiduskaariin (Szabó & Mayor, 2018). Nrp1:n Alkuperäinen assosisaatio pleksiinien kanssa saattaa vaihtua assosisaatioon VEGF-reseptorin kanssa migraation edistämiseksi. Vaihtoehtoisesti, semaforiini signalointi saattaa vaihtua migraatiota estävästä migraatiota edistävään, kuten Sema3C:n ja sydänhermostopienan tapauksessa, tai aksonaalisen ohjauksen aikana (Szabó & Mayor, 2018).

Inhiboivaan signalointiin osallistuvat myös ErbB4, Robo1- ja Robo2-reseptorit, eräät BMP:n säätelytekijät, sekä jotkin ekstrasellulaarisen matriisin komponentit (Szabó &

Mayor, 2018). ErbB4:ää ekspressoidaan rombomeerissä 3, ja sen ligandia neureguliini-1:tä ekspressoidaan rombomeereissä 2 ja 4 (Szabó & Mayor, 2018). Hiirillä ErbB4 ekspressiota vaaditaan estämään rombomeeristä 4 lähtöisin olevien hermostopienan solujen kulkeutuminen rombomeerin 3 vierellä olevaan mesenkyymiin (Szabó & Mayor, 2018). Mekanismi migraation estämisen taustalla ei kuitenkaan ole vielä täysin selvillä. Esimerkiksi ei tiedetä miksi ErbB4:ää ekspressoivan viidennen rombomeerin siirtäminen rombomeerin 3 paikalle ei riitä estämään hermostopienan solujen ektooppista migraatiota (Szabó & Mayor, 2018). Vartalon hermostopienan solujen ekspressoimat Robo1- ja Robo2-reseptorit tarvitaan estämään hermostopienan solujen liian aikaista kulkeutumista dorsolateraaliseen reitille (Szabó & Mayor, 2018). BMP:n säätelijät, kuten DAN/NBL1, osallistuvat kraniaalisen hermostopienan solujen virtoihin rajaamiseen. Vaikka hermostopienan soluja ympäröivän ekstrasellulaarisen matriisin pääkomponentti on niiden migraatiota avittava fibronectiini, niin matriisin toiset komponentit, kuten F-spondiini ja versikaani, inhiboivat migraatiota (Szabó & Mayor, 2018). Versikaani inhiboi yksittäisten solujen liikkuvuutta *in vitro*, häiritsemällä solujen kiinnitymistä fibronectiiniin ja laminiiniin. Näiden molekyylien inhiboiminen johtaa hermostopienan ektooppiseen migraatioon (Szabó & Mayor, 2018).

5.2 Tilan rajaaminen

Ympäröivät kudokset ohjaavat hermostopienan migraatiota myös rajoittamalla niiden käytössä olevaa tilaa toimimalla fyysisenä esteenä (Szabó & Mayor, 2018). Tilan rajaamisen vaikutus solujen migraation ei rajoitu ainoastaan migraatioreittien reunojen määrittämiseen. Lateraalisen tilan rajaaminen esimerkiksi muodostaa eräänlaisen suppilon, joka ohjaa solut kulkemaan samansuuntaisesti, mikä tehostaa niiden migraatiota (Szabó & Mayor, 2018). Vaikka tilaa rajoittavien tekijöiden poisto ei vaikuta suoraan solujen liikkuvuuteen, se kuitenkin häiritsee normaaleja migraatiovirtoja sekä *in vivo*, että *in vitro* (Szabo & Mayor, 2015). Lateraalisen tilan rajaamisen on osoitettu muuttavan solujen kollektiivista migraatiota myös toisissa epiteelisolutyypeissä *in vitro* (Vedula et al., 2012). Kun lateraalisen rajaamisen vaikutusta solujen kollektiiviseen migraation tutkittiin tietokonemallinnuksen avulla, selvisi että rajatun tilan koko leveyssuunnassa vaikuttaa suuresti migraation tehokkuuteen (Szabo & Mayor, 2015). Liiallinen tilan rajaaminen johtaa tilanteeseen, jossa monet solut eivät tilan puutteesta johtuen kykene vaeltamaan oikealle kohdealueelle, kun taas liian laaja migraatiotila johtaa migraatiovirtojen leviämiseen ja solujen päätymiseen väärille alueille (Szabo & Mayor, 2015). Tästä seuraa, että kullekin hermostopienan populaatiolle on olemassa uniikki optimaalinen tilan rajaamisen taso, joka

riippuu migratoivan solupopulaation koosta (Szabo & Mayor, 2015). Tämä optimitason muuntelu tilan ja hermostopienan solujen lukumäärän funktiona on yhdenmukainen eri lajien välillä (Szabo & Mayor, 2015).

Migraatiovirtoihin liittyvien solujen lukumäärää kontrolloidaan geneettisesti, solunjakautumista säätelemällä, kun taas tilan rajaamista säätelee ennalta määrätty inhiboivien signaalien sekvenssi (Szabó & Mayor, 2018). Näiden kahden prosessin välistä koordinoitua ei kuitenkaan vielä tunneta. On myös mahdollista, että nämä kaksi ominaisuutta määräytyvät dynaamisesti, muodostuen seurauksena hermostopienan ja ympäröivän kudoksen välisistä vuorovaikutuksista (Szabó & Mayor, 2018).

Tilan rajallisuus myös ylläpitää korkeaa solutiheyttä. Tämä on osoitettu käyttäen BMP antagonisti DAN:ia, jota ekspressoidaan lateraalisesti premigratorisista kraniaalisen hermostopienan soluista (McLennan et al., 2017). In vitro, DAN laskee migratoivien solujen kulku- ja jakautumisnopeutta. Tämä viittaisi siihen, että DAN hidastaa migraation alkua suuren paikallisen solutiheyden ylläpitämiseksi (McLennan et al., 2017). Korkea solutiheys edesauttaa fyysisiin kontakteihin perustuvaa solujenvälistä viestintää, joka on välttämätöntä solujen kollektiivisen migraation kannalta (Szabó & Mayor, 2018).

6. Solujenväliset vuorovaikutukset

6.1 Kontaktivälitteinen inhibitio

Delaminaation ja EMT:n läpikäymisestä huolimatta hermostopienan solut säilyttävät jonkinasteisen kontaktin toisiinsa kollektiivisen migraationsa aikana (Szabó & Mayor, 2018). Solujen mesenkymaalisen luonteen mukaisesti, nämä kontaktit kestävät yleensä vain lyhyitä hetkiä kerrallaan ja kontaktialueen pinta-ala säilyy pienenä (Szabó & Mayor, 2018). Solukalvokontaktit ovat yleisiä erityisesti aikaisin migratoivissa vartalon ja kraniaalisen hermostopienan soluissa (Szabó & Mayor, 2018). Hermostopienan solut voivat myös muodostaa ohuiden filopodien avulla yhteyksiä soluihin, jotka ovat liian kaukana solukalvokontaktin muodostamiseksi (Teddy & Kulesa, 2004).

Solujen toistensa kanssa kosketuksiin tullessa tapahtuva CIL määritellään tapahtumaksi, jossa kaksi solua muodostaa kontaktin, keskeyttävät liikkumisen koskettamansa solun suuntaan, eroavat ja lähtevät lopulta kulkemaan vastakkaisiin suuntiin (Richardson et al., 2016). CIL saa solut migratoimaan pois päin tiheistä solupopulaatioista ja kohti harvemmin populoituja alueita, mikä saattaa muun muassa johtaa solujen levittäytymiseen, kaavoittumiseen, sekä pitkittyneiden solujen asettautumiseen yhdensuuntaisesti (Szabó &

Mayor, 2018). CIL:n laajojen vaikutuksien vuoksi se on tärkeä tekijä monissa migraatorisissa ja morfogeneettisissä prosesseissa (Stramer & Mayor, 2017).

Sepraakaloilla ja sammakoilla tehdyissä *in vivo* tutkimuksissa CIL:n on osoitettu olevan edellytys hermostopienan normaalille migraatiolle (Szabó & Mayor, 2018). Hermostopienan solujen irtaannuttua neuroepiteelistä, niiden tiheän populaation edessä on laaja hermostopienan soluista vapaa alue, jossa CIL voi vapaasti ohjata soluja pois päin muusta hermostopienasta (Szabó & Mayor, 2018). CIL:n merkitystä solujen kollektiiviselle migraatiolle tukevat monet laskennalliset tutkimukset, joissa on tutkittu CIL:n vaikutusta solujen liikkumiseen, mukaan lukien reorientaatioon ja kemotaksiaan (Szabó & Mayor, 2018).

Sammakoilla CIL:n on havaittu lisäävän solujen liikkeen jatkuvuutta polarisoimalla soluja ja parantamalla niiden kemotaksista vastetta (Theveneau et al., 2010). Eräässä ameeboilla tehdyssä tutkimuksessa havaittiin, että CIL:n merkittävin ominaisuus on solujen liikkuvuuden parantaminen (Szabó & Mayor, 2018). Vaikka tätä löydöstä ei ole vielä varmennettu hermostopienan soluilla, CIL: tiedetään indusoivan traktiovoimia (engl. traction forces) hermostopienan soluilla, mikä viittaa liikkuvuuden kasvamiseen (Szabó & Mayor, 2018). Indusoidut traktiovoimat ovat myös tärkeitä hermostopienan solujen eriytymiselle, mikä jälleen viittaa liikkuvuuden kasvamiseen (Szabó & Mayor, 2018).

Vaikka solu kykenisi CIL:iin ei se kuitenkaan tarkoita, että repolarisaatio ja suunnan muutos tapahtuisivat jokaisen törmäyksen yhteydessä. Tämä johtuu siitä, että repolarisaatio ja eriytyminen ovat riippuvaisia solun tilasta, kuten migraatiovaiheesta, ekspressioprofiilista, törmäävien solujen identiteeteistä ja törmäyskulmasta (Szabó & Mayor, 2018). Eräät tutkimukset viittaavat siihen, että CIL edistää kollektiivista migraatiota tehokkaimmin silloin, kun CIL-vasteen todennäköisyys on keskisuuralla tasolla (Szabó & Mayor, 2018). Eräässä teoreettisessa tutkimuksessa saadut tulokset näyttävät, että CIL-vasteen todennäköisyyttä säätämällä voidaan vaikuttaa epiteelisolujen suuren mittakaavan järjestäytymiseen, mistä johtuen voi olla vaikeaa havaita tapahtuuko CIL:iä jossain tietyssä solupopulaatiossa (Szabó & Mayor, 2018). Kontaktin muodostavien solujen eriytyminen toisistaan saattaa olla minimaalista, ja näin ollen kontaktin päättymistä ei välttämättä huomata. Tätä tapahtuu herkästi solutiheyden ollessa korkea (Szabó & Mayor, 2018). Näitä havaitsemisvaikeuksia voidaan kompensoida käyttämällä korkean resoluution kuvantamismenetelmiä, tai seuraamalla solujen välisten kontaktien muodostumista ja purkautumista molekyylimarkkerien avulla (Szabó & Mayor, 2018).

CIL:n aikana solujen yhteentörmäyksen seurauksena muodostuu nopeasti solujenvälinen adheesiokompleksi (Szabó & Mayor, 2018). Migraation alkaessa sammakon kraniaalisen hermostopienan solujen adheesiomolekyylien ekspressio muuttuu: E-kadheriinin asemasta ekspressoidaan N-kadheriinia ja samaan aikaan solut alkavat toteuttamaan CIL-käyttäytymistä (Szabó & Mayor, 2018). Kontaktin muodostuessa p120- ja α -kateniini-molekyyliä rekrytoidaan solujen väliseen liitokseen sekä migratoorisissa, että pre-migratoorisissa soluissa, mikä viittaa funktionaalisten adheesiokompleksien muodostumiseen (Szabó & Mayor, 2018). Solujenvälisten kontaktien aikana aktivoituu PCP-signaali (engl. planar cell polarity signaling), johon sisältyy frizzled-reseptorien Fz7, strabismus ja dishevelled rekrytointi, sekä ei-kanonisen Wnt signaaloinnin aktivointi (Szabó & Mayor, 2018). N-kadheriinin tai Wnt/PCP-signaaloinnin inhibitio johtaa CIL:n häiriöihin, joissa hermostopienan soluille muodostuu ektooppisia ulokkeita, ja ne pyrkivät migratoimaan toistensa ylitse.

Yksi Wnt-signaaloinnin kohteista on RhoA, pienikokoinen GTPaasi, joka aktivoi aktomyosiinin supistumista (Szabó & Mayor, 2018). Migraation aikana RhoA purkaa solun ja ekstrasellulaarisen matriisin välisiä adheesiokomplekseja solun kulkusuunnan vastaisella puolella, kun taas toinen pieni GTPaasi, Rac1 on aktiivinen solun etupuolella, missä se ohjaa solun ulokkeita kulkusuuntaa kohti edistämällä aktiivisen polymerisaatiota (Szabó & Mayor, 2018). CIL:iä läpikäyvissä hermostopienan soluissa Rac1 poistetaan kontaktialueelta RhoA:n toimesta, mikä selittää solun ulokkeiden vetäytymisen kontaktialueelta (Szabó & Mayor, 2018). Lisäksi Syndecan4-signaali heikentää intrasellulaarista Rac1 aktiiviteettia ja tukee Rac1:n polarisaatiota migratoivissa soluissa (Szabó & Mayor, 2018). Pre-migratoriset solut, joiden CIL käyttö ei ole vielä alkanut, polarisoivat Rac1:n aktiivisuutta kohti solujen välistä kontaktipintaa, mikä pitää soluja yhdessä. Vastaavasti, jos Rac1 inhiboidaan ulokkeissa, jotka suuntautuvat kontaktipinnasta ulospäin, solut eivät kykene irtaantumaan kontaktin jälkeen (Szabó & Mayor, 2018).

Komplementaarissa premigratoorisilla soluilla tehdyissä tutkimuksissa havaittiin, että Rac1:n aktivaatio CIL:iä läpikäymättömissä soluissa kontaktipinnasta kaukana olevilla alueilla indusoi CIL:n kaltaista solujen eriytymistä (Szabó & Mayor, 2018). Näistä tuloksista voidaan päätellä, että CIL:n aikana solut vetävät itsensä erilleen toisistaan kontaktialueelta ulospäin suuntautuvien ulokkeiden avulla (Szabó & Mayor, 2018). Tätä tukevat lisäksi havainnot siitä, että traktiovoimat kerääntyvät migratooristen hermostopienan solujen vapaalle reunalle edistämään solujen erkanemista, kun taas CIL-ominaisuuksien puuttuessa,

traktiovoimia muodostuu lähinnä solujen kontaktipintojen tuntumaan (Szabó & Mayor, 2018).

Kadheriinipohjaisten sidosten lisäksi migratooriset hermostopienan solut liittyvät toisiinsa aukkoliitoksilla, jotka vaikuttavat solun polariteettiin, polarisaatiokykyyn, ja kykyyn ekstrasellulaariseen tilaan eritettyihin semaforiineihin (Szabó & Mayor, 2018). Aukkoliitokset antavat hermostopienan solujen reagoida ulkoisiin viesteihin, minkä vuoksi niiden oletetaan hyödyttävän soluryhmiä enemmän kuin yksittäisiä soluja (Szabó & Mayor, 2018). Tässä mielessä aukkoliitokset, sekä kadheriinipohjaiset sidokset voisivat toimia yhdessä.

CIL on siis mekanismi, joka johtaa solujen dispersioon ja yksittäisten solujen migraatioon. Tästä huolimatta hermostopienan solut migratoivat ryhminä. Ryhmien yhdessä pysymisen kollektiivisen migraation aikana mahdollistaa soluja toisiaan kohti ohjaavat vuorovaikutukset, joista merkittävin on kemotaksia (Szabó & Mayor, 2018).

6.2 Kemotaksia

Kemotaksialla viitataan prosessiin, jossa solu kulkee solun ulkopuolisen liukoisien faktorien gradientin suuntaisesti (Shellard, 2016). Näitä faktoreita kutustaan kemoattraktanteiksi tai kemorepellenteiksi sen mukaan kulkeeko solu kohti tiheämpää gradienttia vai siitä poispäin ja, jotta jotain ainetta voidaan pitää kemoattraktanttina, sen on täytettävä tietyt kriteerit (Shellard, 2016). Migratoivan solun on ekspressoitava kemoattraktantin reseptoria oikealla ajan hetkellä, kemoattraktanttireseptorin puuttumisen tulee johtaa virheelliseen migraatioon, solujen tulee migratoida kohti attraktanttia *in vitro*, solujen migraation tulee häiriintyä attraktantin lisäämisestä väärälle alueelle *in vivo*, ja on kyettävä osoittamaan, että solut kulkevat nimenomaan aineen gradientin suuntaisesti (Shellard, 2016). Mikäli jotain näistä ehdoista ei kyetä osoittamaan, kyseessä on kemotaksian sijasta kemokineesi eli prosessi, jossa jokin faktori edistää migraatiota, mutta ei ohjaa sen suuntaa (Shellard, 2016). Kemotaksian osuudesta hermostopienan kehityksessä on esitetty useita hypoteesejä, mutta yhdessäkään niistä ei olla onnistuttu osoittamaan kaikkia edellä mainittuja kemotaksian piirteitä, vaikka muutaman molekyylin, kuten SDF1 ja VEGF, kohdalla todistusaineisto on erittäin vahva (Shellard, 2016).

SDF-1 on molekyyli, jonka tiedetään osallistuvan useisiin migraatiotapahtumiin alkionkehityksen aikana, ja sillä on pitkään epäilty olevan myös rooli hermostopienan kehityksessä (Shellard, 2016). Monissa eläinlajeissa on havaittu SDF-1:n ekspressiota hermostopienan migraatioreiteillä ja useilla näistä lajeista hermostopienan solut

ekspressoivat sen reseptoria (Shellard, 2016). SDF-1:n mahdollista kemotaksista toimintaa kuitenkin olla testattu ja lintujen kohdalla se vaikuttaa erityisen epävarmalta, sillä niillä SDF-1 ei esiinny gradienttina (Shellard, 2016). Hermostopienan solujen kemotaksiasta SDF-1:n suhteen on kuitenkin olemassa jonkin verran todisteita. Esimerkiksi CXCR4:ää ekspressoivien solujen on havaittu olevan kemotaktisia SDF-1:n suhteen *in vitro* a (Shellard, 2016). Lisäksi SDF-1:n ekspressiossa tapahtuvien muutosten on havaittu aiheuttavan kehityshäiriöitä, joiden tiedetään johtuvan hermostopienan solujen virheellisestä migraatiosta (Shellard, 2016). SDF-1:llä on myös osoitettu olevan vaikutusta siihen vaeltavatko hermostopienan solut sympaattisen hermoston hermosolmuihin vai spinaaliganglioihin (Shellard, 2016).

Hermostopienan migraation aikana pään alueen ektodermi ekspressoii VEGF:ää ja kraniaalisen hermostopienan solut sen reseptoria (Shellard, 2016). VEGF ekspressio keskittyy myöhemmin toisen kiduskaaren alueelle, ja sen läsnäolon on osoitettu olevan välttämätön hermostopienan solujen migraatiossa kyseiseen kaareen (Shellard, 2016). *In vitro* VEGF:n on osoitettu vetävän hermostopienan soluja puoleensa, ja *in vivo* on osoitettu, että ektooppinen VEGF häiritsee neljänneistä rhombomeeristä lähtöisin olevien hermostopienan solujen migraatiota (Shellard, 2016). VEGF:n vaikutusmekanismia solujen migraatioon ei vielä tunneta, eikä yhdessäkään tutkimuksessa ole löydetty selkeää VEGF.gradienttia (Shellard, 2016). VEGF:n vaikutusta migraatioon ei siis vielä toistaiseksi voida pitää kemotaksiana.

Edellä mainitut tapaukset ovat esimerkkejä pitkän kantomatkan kemotaksiasta. Hermostopienan kehityksessä on myös havaittu tapahtumia, joiden oletetaan johtuvan lyhyen kantomatkan kemotaksiasta, jossa vuorovaikuttavat solut ovat hyvin lähellä toisiaan (Shellard, 2016).

Pään alueen plakodit ovat ektodermin tihtentymiä, jotka osallistuvat pään alueen aistielinten muodostukseen. Plakodien solut erittävät SDF-1:tä ja niiden on osoitettu vetävän puoleensa SDF-1:n reseptoria ekspressoivia hermostopienan soluja *in vitro* (Shellard, 2016). Solujen vuorovaikutuksia tutkittaessa on havaittu plakodisolujen työntyvän erilleen hermostopienan soluista CIL:n vaikutuksesta niiden tullessa kosketuksiin toistensa kanssa (Shellard, 2016). Tästä seuraa ilmiö, jossa hermostopienan solut seuraavat plakodeja SDF-1:n houkuttelemina, ja plakodit pakenevat niitä seuraavia soluja CIL:n vaikutuksesta (Shellard, 2016). Tästä prosessista käytetään nimitystä “chase and run” ja se on tärkeä osa molempien solupopulaatioiden migraatiota (Shellard, 2016).

Lyhyen kantamatkan kemotaksialla on myös esitetty olevan osuutta solujen kollektiiviseen migraatioon ylläpitämällä migratoivan solupopulaation koheesiota (Shellard, 2016). Hermostopienan solut ekspressoivat sekä komplementtifaktoria C3a, että sen reseptoria C3aR. Komplementtifaktorin pitoisuus on korkea siellä missä solutiheys on korkea (Shellard, 2016). C3aR-reseptoria ekspressoivat solut kulkevat C3a-gradientin suuntaisesti, minkä seurauksena solut kerääntyvät tiheiksi ryhmiksi ja ryhmästä erilleen joutuneet solut ohjautuvat takaisin sen luokse (Shellard, 2016). Tätä lyhyen kantamatkan kemotaksiaa kutsutaan koattraktioksi (engl co-attraction). Koattraktiota tarvitaan soluja erilleen työntävän CIL:n vastavoimaksi (Shellard, 2016). C3a:n ja sen reseptorin inhiboimisella on osoitettu aiheuttavan solujen koheesion heikkenemistä ja lisäksi matemaattiset mallit osoittavat, että solujen kollektiivinen migraatio vaatii CIL:n vastavoimaksi koattraktion kaltaisen ilmiön (Shellard, 2016). Koattraktion tarkkaa molekulaarista mekanismia ei kuitenkaan vielä tunneta (Shellard, 2016).

7. Hermostopienan tutkimuksen tulevaisuus

Tietämyksemme hermostopienan synnystä, muodostumisesta, migraatiosta, ja erilaistumisesta, sekä näitä ohjaavista mekanismeista on hankittu vuosikymmenten työn kautta, mutta jäljellä on vielä lukuisia selvittämättömiä kysymyksiä.

Esimerkiksi solujen erikoistumisen määräytymisen tarkka ajankohta on edelleen kiistelyn kohteena intensiivisistä tutkimuksesta huolimatta (Mayor, 2013). Ei ole tarkalleen tiedossa, onko hermostopienan solujen kehityssuunta määräytynyt jo välittömästi induktion jälkeen, vai säilyttävätkö ne erikoistumiskykynsä pidempään, menettäen sen asteittain migraation edetessä (Mayor, 2013). Vaikka tutkimusdata viittaa siihen, että suurimmalla osalla hermostopienan soluista kehityssuunta ei ole ennalta määrätty, vaan ne erikoistuvat migraation aikana vastaanottamiensa signaalien vaikutuksesta, joidenkin solujen kohdalla kehitys kuitenkin vaikuttaa olevan määrätty induktion aikana, jo ennen migraation alkamista (Mayor, 2013). Näin ollen hermostopienana vaikuttaisi olevan heterogeeninen populaatio soluja, joiden multipotenttisuuden ja plastisuuden tasot vaihtelevat. Monet hermostopienan induktion aikana aktiiviset geenit, kuten *Snail* ja *FoxD3*, kontrolloivat myös solujen migraation lähtölaukauksena toimivaa EMT:tä (Mayanil, 2013). EMT:llä on lisäksi osoitettu olevan yhteys kantasoluominaisuuksien muodostumiseen. Tämä herättää mielenkiintoisen mahdollisuuden siitä, että hermostopienan multipotenttisuus ja hermostopienan migraation alkaminen ovat yhteydessä toisiinsa, ja niitä säädellään samanaikaisesti osana EMT:tä (Mayor, 2013).

Myös kemotaksian osuudesta hermostopienan migraatioon on vielä paljon selvitettävää. Vaikka kemotaksian esiintymisestä voidaan olla lähes varmoja, ja sen välttämättömyys solujen yhdessä pysymiselle kollektiivisen migraation aikana on osoitettu tietokonemallinnuksissa, niin yhtäkään ainetta ei olla pystytty kiistatta osoittamaan kemoattraktantiksi, mikä johtuu lähinnä siitä, että yhdelläkään kemoattraktantiksi epäillyllä aineella ei olla onnistuttu havaitsemaan gradeerattuja ekspressiokuvioita (Shellard, 2016). Tämä todennäköisesti muuttuu lähiaikoina parempien *in vivo* kuvantamismenetelmien kehittymisen myötä (Shellard, 2016).

Monet hermostopienan solujen migraation piirteet muistuttavat syövän etäpesäkkeiden muodostumisessa esiintyviä mekanismeja, mikä viittaa siihen, että hermostopienan kehityksen aikana aktiiviset mekanismit käynnistyvät uudelleen syöpäsoluissa (Szabó & Mayor, 2018). Yhtäläisyyksiä löytyy muun muassa signalointiin käytetyistä molekyyleistä, EMT:stä ja migraation ohjautumisesta (Szabó & Mayor, 2018). Hermostopienan migraatiomekanismien tarkempi tutkiminen saattaa siis auttaa syöpäsolujen leviämisen ymmärtämisessä.

Kaiken kaikkiaan hermostopienan kehitys tarjoaa oivan mallin monien prosessien, kuten EMT:n aikaisen adheesion säätelyn, solujen kollektiivisen migraation, sekä migratoivien solujen ja niiden ympäristön välisten vuorovaikutusten tutkimiseen. Tutkimalla eroja eri lajien hermostopienojen kehittymisen välillä voidaan saada uutta tietoa selkäjänteisten evoluutiosta. Hermostopienan tutkimisesta saaduilla tiedoilla saattaa myös olla lääketieteellisiä sovelluksia syövän ja kehityshäiriöiden hoitamisessa (Mayor, 2013).

8. Viiteluottelo

- Bershadsky, A. D. (2011). Crawling cell locomotion revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(51), 20275. doi:10.1073/pnas.1116814108
- Clay, M. R. (2011). Regulation of cell adhesions and motility during initiation of neural crest migration. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(1), 17-22. doi:10.1016/j.conb.2010.09.013
- Lee, Y. (2011). Cardiac neural crest is dispensable for outflow tract septation in xenopus. *Development (Cambridge, England)*, 138(10), 2025. doi:10.1242/dev.061614
- Mayanil, C. S. (2013). Transcriptional and epigenetic regulation of neural crest induction during neurulation. *Developmental Neuroscience*, 35(5), 361-372. doi:10.1159/000354749
- Mayor, R. (2013). The neural crest. *Development (Cambridge, England)*, 140(11), 2247. doi:10.1242/dev.091751
- Mcclay, D. R. (1991). Gastrulation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1(2), 191-195. doi:10.1016/S0959-437X(05)80069-3
- McLennan, R., Bailey, C. M., Schumacher, L. J., Teddy, J. M., Morrison, J. A., Kasemeier-Kulesa, J. C., . . . Kulesa, P. M. (2017). DAN (NBL1) promotes collective neural crest migration by restraining uncontrolled invasion. *Journal of Cell Biology*, 216(10), 3339-3354. doi:10.1083/jcb.201612169
- Richardson, J., Gauert, A., Briones Montecinos, L., Fanlo, L., Alhashem, Z. M., Assar, R., . . . Linker, C. (2016). Leader cells define directionality of trunk, but not cranial, neural crest cell migration. *Cell Reports*, 15(9), 2076-2088. doi:10.1016/j.celrep.2016.04.067
- Rothstein, M. (2018). The molecular basis of neural crest axial identity. *Developmental Biology*, 444, S170. doi:10.1016/j.ydbio.2018.07.026
- Sariola, H., Sariola, H., Frilander, M., & Ripatti, T. (2015). *Kehitysbiologia : Solusta yksilöksi* (2. uud. p. ed.). Helsinki: Duodecim.

- Schilling, T. (1996). Jaw and branchial arch mutants in zebrafish .1. branchial arches. *Development*, 123, 329-344.
- Shellard, A. (2016). Chemotaxis during neural crest migration. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 55, 111-118. doi:10.1016/j.semcdb.2016.01.031
- Solnica-Krezel, L., & Sepich, D. S. (2012). *Gastrulation: Making and shaping germ layers* doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154043
- Stramer, B., & Mayor, R. (2017). Mechanisms and in vivo functions of contact inhibition of locomotion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(1), 43-55. doi:10.1038/nrm.2016.118
- Szabó, A., & Mayor, R. (2018). *Mechanisms of neural crest migration* doi:10.1146/annurev-genet-120417-031559
- Szabo, A., & Mayor, R. (2015). Cell traction in collective cell migration and morphogenesis: The chase and run mechanism. *Cell Adhesion & Migration*, 9(5), 380-383. doi:10.1080/19336918.2015.1019997
- Teddy, J. M., & Kulesa, P. M. (2004). In vivo evidence for short- and long-range cell communication in cranial neural crest cells. *Development*, 131(24), 6141-6151. doi:10.1242/dev.01534
- Theveneau, E. (2012). Neural crest delamination and migration: From epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Developmental Biology*, 366(1), 34-54. doi:10.1016/j.ydbio.2011.12.041
- Theveneau, E., Marchant, L., Kuriyama, S., Gull, M., Moepps, B., Parsons, M., & Mayor, R. (2010). Collective chemotaxis requires contact-dependent cell polarity. *Developmental Cell*, 19(1), 39-53. doi:10.1016/j.devcel.2010.06.012
- Vedula, S. R. K., Leong, M. C., Lai, T. L., Hersen, P., Kabla, A. J., Lim, C. T., & Ladoux, B. (2012). Emerging modes of collective cell migration induced by geometrical constraints. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(32), 12974-12979. doi:10.1073/pnas.1119313109

Kypsyysnäyte

Hermostopiena on selkärankaisten alkionkehityksen aikana esiintyvä monikykyisiä soluista muodostuva väliaikainen rakenne, jonka solut vaeltavat joka puolelle alkiota, lopulta erilaistuen moniksi eri rakenteiksi. Hermostopienan muodostumisella on ollut tärkeä rooli selkärankaisten evoluutiossa, sen solujen vaellus jakaa piirteitä syövän metastaasin kanssa ja monet ihmisillä esiintyvät syndroomat johtuvat sen kehityshäiriöistä. Näistä piirteistä johtuen hermostopienasta on tullut houkutteleva kohde kehitys- ja evoluutiobiologeille, sekä syöpäbiologeille ja patologeille.

Hermostopiena indusoituu alkionkehityksen neurulaatiovaiheen aikana hermostolevyn sivureunoille. Neurulaation jälkeen hermostopienan solut alkavat käymään läpi epiteeli-mesenkyyymi-transitiota, irtaantuen samalla neuroepiteelistä, kun soluja vahvasti yhteen sitovien kadheriinimolekyylien sijasta aletaan ekspressoimaan heikompia sidoksia muodostavia kadheriineja. Irtaannuttuaan neuroepiteelistä, solut lähtevät vaeltamaan tarkasti säädeltyinä virtoina kohti kohdealueitaan.

Hermostopiena voidaan jakaa neljään alapopulaatioon solujen lähtöpaikan, kohdealueen ja niistä syntyvien johdannaisten mukaan. Kraniaalinen hermostopiena tuottaa pään alueen luita ja hermoja, vageaalinen hermostopiena sydämen lihaksia ja etusuolen hermostoa, vartalon hermostopiena ääreishermoston ja lisämunuaisten soluja ja sakraalinen hermostopiena enterisen hermoston soluja.

Soluja ympäröivät kudokset osallistuvat vaellusreittien rajaamiseen erittämällä solujen liikettä inhiboivia molekyylejä. Kudokset voivat myös ohjata solujen liikkumista toimimalla fyysisinä esteinä, rajaten täten solujen käytössä olevaa tilaa. Tilan oikeanlaisella rajaamisella voi myös vauhdittaa solujen liikettä haluttuun suuntaan.

Solujenvälisillä vuorovaikutuksilla, kuten kontaktivälitteisellä inhibitiolla ja kemotaksialla, on myös osuus vaellusreittien säätelyssä. Kontaktivälitteisessä inhibitiossa

toistensa kanssa kosketuksiin tulevat solut lähtevät liikkeelle päinvastaisiin suuntiin, mikä estää solujen päällekkäisen asettumisen. Kemotaksiassa solut kulkevat jonkin viestiaineen gradientin suuntaisesti. Erittämällä tällaisia viestiaineita itse, solut pysyvät tiiviinä ryhminä vaelluksen ajan.

Hermostopienan kehityksen mekanismien selvittäminen on vaatinut vuosikymmenten työn, mutta paljon on vielä selvittämättä. Avoimiin kysymyksiin, kuten yhteyksistä syöpään, tullaan toivottavasti löytämään vastauksia kuvantamismenetelmien kehittymisen myötä.

.